12 月 December
2019, 62(12): 1351 - 1358
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: //www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.12.001

RNAi 和取食不同品种水稻后白背飞虱多铜氧化酶 4 基因的表达差异及生物学效应

贾浩康，刘玉娣*，侯茂林

（中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要：【目的】分析 RNAi 及取食不同品种水稻后白背飞虱 *Sogatella furcifera* 多铜氧化酶 4(multicopper oxidase 4, MCO4)基因的表达差异和生物学效应，以期为该基因的功能研究提供理论依据。【方法】通过生物信息学技术方法分析白背飞虱 MCO4 基因的核苷酸和氨基酸序列；利用 RNAi 技术沉默白背飞虱 3 龄若虫的 MCO4 基因，检测显微注射法和饲喂法的沉默效率，研究该基因被干扰后对白背飞虱 3 龄若虫存活率的影响；白背飞虱成虫取食不同抗性水稻品种 24 h 后，采用 RT-qPCR 检测其体内 MCO4 基因表达量的变化，并统计其体重。【结果】白背飞虱 MCO4 基因的核苷酸序列全长为 2 166 bp，编码 721 个氨基酸。显微注射法进行 MCO4 基因的 RNAi 可成功沉默白背飞虱的 MCO4 基因，且沉默效率远高于饲喂法。MCO4 基因被 RNAi 沉默后白背飞虱 3 龄若虫存活率显著低于正常若虫的。与取食水稻感虫品种 TN1 相比，取食水稻抗虫品种 IR26 的成虫 MCO4 基因表达量显著增加，且成虫体重显著降低。【结论】显微注射法可以更好地干扰白背飞虱 MC04 基因的表达。沉默 MCO4 基因对白背飞虱 3 龄若虫的存活率有显著影响，我们推测 MCO4 基因在白背飞虱取食水稻中具有重要的作用。

关键词：白背飞虱；唾液；多铜氧化酶 4；RNAi；显微注射法；饲喂法

中图分类号：S433　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2019)12-1351-08

Differential expression of multicopper oxidase 4 gene and biological effects after RNAi and feeding on different rice varieties in *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae)

JIA Hao-Kang, LIU Yu-Di*, HOU Mao-Lin (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】The study aims to analyze the expression difference of multicopper oxidase 4 gene and the biological effects after RNAi and feeding on different rice varieties in *Sogatella furcifera*, so as to provide a theoretical basis for fundamental function research of this gene.【Methods】The nucleotide and amino acid sequences of MCO4 gene were analyzed by bioinformatic methods. The MCO4 gene in the 3rd instar nymphs of *S. furcifera* was silenced by RNAi, the silencing efficiencies of microinjection method and feeding method were compared, and the effect of RNAi of MCO4 gene on the survival rate of the 3rd instar nymphs was studied. After feeding on rice varieties with different insect resistance for 24 h, the changes in the expression level of *MCO4* in *S. furcifera* adults were detected by RT-qPCR, and their body weight was detected.【Results】The full-length cDNA of MCO4 gene is 2 166 bp, encoding 721 amino

---

基金项目：国家重点研发计划(2018YFD0200200)；国家自然科学基金项目(31772538)

作者简介：贾浩康，男，1995 年生，山东青岛人，硕士研究生，研究方向为昆虫生化与分子生物学，E-mail: 2997929340@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ydliu@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2019-08-07；接受日期 Accepted: 2019-10-24

acids. RNAi by microinjection method successfully silenced the MCO4 gene of *S. furcifera*, with much higher silencing efficiency than that by feeding method. The survival rate of the 3rd instar nymphs with silenced *MCO4* was significantly lower than that of the normal nymphs. Compared with the adults fed on the susceptible cultivar TN1, the adults fed on the resistant variety IR26 had significantly higher expression level of *MCO4* and significantly reduced body weight. 【Conclusion】Microinjection method can more efficiently silence the MCO4 gene of *S. furcifera*. Silence of MCO4 gene has significant effects on the survival rate of *S. furcifera*, and we speculate that MCO4 plays an important role in feeding of *S. furcifera* on rice.

Key words: *Sogatella furcifera*; saliva; multicopper oxidase 4; RNAi; microinjection method; feeding method

白背飞虱 *Sogatella furcifera* 是危害水稻的重要刺吸式害虫,其成虫和若虫不仅能取食各个生育期水稻,还能传播多种水稻病毒病,给水稻的生产带来巨大的经济损失,严重威胁着我国的水稻生产(沈君辉等, 2003)。化学农药的长期使用,不仅造成白背飞虱的抗药性逐渐增强,还给环境带来了难以估量的影响。利用 RNA 干扰发掘高效专一性基因,为害虫的防治工作开辟新的途径。

多铜氧化酶 4(multicopper oxidase 4, MCO4)在动物、植物、细菌、真菌中都有分布。多铜氧化酶家族包括漆酶(Loera Corral *et al.*, 2006)、胆红素氧化酶、抗坏血酸氧化酶和一部分金属氧化酶(Ye *et al.*, 2015)。多铜氧化酶在昆虫的进化和结构上发挥着重要作用。据目前的研究,虫漆酶(laccase)在昆虫表皮的硬化(Andersen *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 2001)、木质素和角质层鞣制的降解(Hoegger *et al.*, 2010)、昆虫的免疫反应(Gregorio *et al.*, 2001)以及取食过程中有毒物质的新陈代谢上(Dittmer *et al.*, 2004)发挥着重要作用。抗坏血酸氧化酶是植食性昆虫氧化防御反应的重要组成成分,在昆虫与植物的取食互作中发挥着重要作用。目前在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的研究中共推断出其基因组中编码多铜氧化酶的基因有 7 个,分别是 *MCO1* – *MCO7* (Ye *et al.*, 2015)。其中 *MCO1* 和 *MCO2* 是保守基因,*MCO1* 在褐飞虱大多数组织中表达;*MCO2* 主要在表皮中表达,并在蜕皮期达到表达高峰;*MCO3* 在成虫的卵巢中特异表达;*MCO4* 在褐飞虱唾液腺的各个发育阶段中表达;*MCO5* 主要在 4 龄若虫的中肠内短期表达;*MCO6* 与 *MCO2* 的表达模式相似,其表达与褐飞虱的蜕皮有密切关系(Bento *et al.*, 2005);而 *MCO7* 主要在肠道和马氏管中表达(Li *et al.*, 2016)。本实验室已有的检测结果发现 MCO4 基因在白背飞虱的各个发育阶段中均在唾液腺中特异表达,通过对白背飞虱雌雄成虫唾液腺 RNA 的提取和测序,我们获得了白背飞虱 MCO4 基因的全长序列(GenBank 登录号: KU764431)(Li *et al.*, 2016)。

RNAi 是研究基因功能的重要工具,目前主要使用的干扰方法有浸泡法、饲喂法和显微注射法(Zhang *et al.*, 2010)。由于受昆虫种类、体型、发育阶段以及其他因素的影响,不同干扰方法的干扰效率会有较大的差异。依据白背飞虱的生物学特性,本研究选择饲喂法和显微注射法导入 *MCO4* dsRNA,检测不同导入方法的沉默效果以及 MCO4 基因被干扰后对白背飞虱存活率的影响,同时进一步检测了白背飞虱取食不同的抗感水稻品种后对 MCO4 基因表达的影响和生物学效应,以期探索多铜氧化酶基因的生物学功能,为白背飞虱的科学防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与植株

本实验中供试昆虫白背飞虱是由 2015 年采集于广西省桂林市兴安县的原始种群扩繁得到,在 80 目防虫笼罩(50 cm × 50 cm × 50 cm)内用分蘖期水稻苗(TN1)群体饲养于人工气候箱(温度 27 ± 1℃,相对湿度 75% ~ 80%,光周期 16L: 8D)中,饲养 10 代以上。本实验采用的水稻品种为感虫品种 TN1 以及抗虫品种 IR26 和 IR36 共 3 个品种的分蘖期水稻苗。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司,氯仿、异戊醇均为国产分析纯,反转录试剂盒 Fast Quant RT Kit 购于天根生化科技有限公司,质粒提取试剂盒为 Axygen 公司产品,dsRNA 合成试剂盒 MEGA Script T7 Transcription Kit 为

Thermo Fisher Scientific 公司产品，水饱和酚购于北京酷莱博科技有限公司。

1.3 白背飞虱 MCO4 基因的序列分析

基于之前获得的白背飞虱 MCO4 基因的全长序列（GenBank 登录号：KU764431）（Li *et al*., 2016），通过 SignalP 4.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测 MCO4 蛋白的信号肽及切除位点。用 TMHMM Server v. 2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）对该蛋白的跨膜区域进行预测。通过 ExPASy ProtParam Tool（http://web.expasy.org/protparam/）预测蛋白的分子量和等电点。通过搜索该蛋白的 Uniprot 数据库（http://www.uniprot.org/）预测功能保守区域和铜结合位点。用 NCBI BlastX（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）对 MCO4 基因核酸序列进行同源性检索，然后应用 ClustalX2 软件进行序列相似性分析。采用 MEGA 5.0 软件利用最大邻接（neighbor-joining, NJ）法，Bootstrap 值设置为 1 000，构建系统进化树（Tamura *et al*., 2013）。

1.4 引物设计及合成

根据白背飞虱转绿组数据库 MCO4 基因核苷酸序列，利用 Primer5.0 软件设计 MCO4 基因扩增引物，RT-qPCR 和 dsRNA 引物由上海生工生物有限公司合成（表 1）。

表 1　本研究所用引物信息

Table 1　Information of primers used in this study

基因 Gene	引物序列（5′-3′） Primer sequence	产物大小（bp） Product size	用途 Purpose
MCO4 (250-F, 1702-R)*	F：CTTCATACCTCGTAGCGGATT R：GTTCACAGTGTTGGTCATTGG	1 452	基因扩增 Gene amplification
MCO4	F：CCCTTCTGGTGTACACGGAT R：CCCAATGGTGCCAACTGATC	199	RT-qPCR
L9	F：CAAGATGAGAGCCGTGTA R：CGAGTTGGTAACAGTGAC	142	
L10	F：GCGACTTCATCCGTTCCA R：CACTCTAGCCACTGTTCCTT	121	
MCO4	F：taatacgactcactatagggAAAATGGTATGGGAGGGTCTA R：taatacgactcactatagggGCAACTGTCTTCGGTTGTGTAT	582	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
GFP	F：taatacgactcactatagggGGAGAAGAACTTTTCACTGG R：taatacgactcactatagggAGTTGAACGGATCCATCTTC	564	

* 引物在序列中的位置 Location of the primers in the sequence. 小写字母表示 T7 启动子序列。Lowercase letters stand for T7 promoter sequence.

1.5 cDNA 的合成

使用总 RNA 提取试剂盒提取白背飞虱总 RNA。cDNA 第 1 链的合成按照反转录试剂盒 Fast Quant RT Kit 试剂盒说明书进行。

1.6 白背飞虱 MCO4 基因的沉默及效率检测

利用 MCO4 基因扩增引物验证基因全长，并以白背飞虱 cDNA 为模板，白背飞虱 *MCO4* dsRNA 和 *GFP* dsRNA 体外合成参照 MEGAscript T7 Transcription Kit 试剂盒的说明书进行，利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对 dsRNA 进行电泳检测。

饲喂法：根据褐飞虱人工饲料喂养方法，取直径 3 cm、长 5 cm 两端开口的透明玻璃管，将玻璃管的一端用单层Parafilm® M膜包裹，从开口的另一端用吸虫管移入 50 头 3 龄若虫，接着用单层 Parafilm M 膜包裹，用移液枪注射 5 mL 人工饲料，再用另一片 Parafilm® M膜贴附在液体饲料上重复封口。倒置试管轻拍试管底部，使白背飞虱 3 龄若虫聚集在有人工饲料的一端。将玻璃管平放于人工气候箱中（温度 27 ± 1℃，相对湿度 75% ~ 80%，光周期 16L:8D），每 24 h 更换 1 次饲料。为了明确干扰效果的最佳天数，分别收集取食含 0.5 μg/μL ds*MCO4* 人工饲料 2，4，6 和 8 d 后的白背飞虱 3 龄若虫各 3 头，同时以饲喂含 ds*GFP* 人工饲料的白背飞虱 3 龄若虫为对照。

显微注射法：取 50 头白背飞虱 3 龄若虫，利用 TransferMan NK2 型显微注射仪器（Eppendorf，德国）将 dsRNA 注射到虫体的腹部前胸和中胸节膜间。每头注射 50 nL dsRNA（4 μg/μL）。设置 ds*MCO4* 和 ds*GFP* 组，注射后将同批次的白背飞虱 3 龄若虫移入人工气候培养箱内新鲜的 TN1 水稻上恢复 24 h，用于下一步实验。将未进行任何处理的白背飞虱 3 龄若虫饲养于相同环境中，作为 CK 组，用于检测

MCO4 沉默对白背飞虱存活率的影响。

RNAi 处理后白背飞虱 cDNA 合成同 1.5 节。利用 RT-qPCR 检测 RNAi 处理后白背飞虱 MCO4 基因的表达水平，判断饲喂法及显微注射法的干扰效果。以核糖体蛋白 L9（ribosomal protein L9）和核糖体蛋白 L10（ribosomal protein L10）基因作为内参基因进行 RT-qPCR。RT-qPCR 的反应体系：SYBR Premix ExTaq^{TM}（2 ×）10 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 0.4 μL，ROX Reference Dye（50 ×）0.04 μL，cDNA 模板（20 ng）4 μL，超纯水补足至 20 μL。RT-qPCR 反应程序：95℃ 2 min；95℃ 10 s，60℃ 31 s，40 个循环。

1.7 MCO4 基因沉默后白背飞虱存活率检测

收集 1.6 节显微注射 ds*MCO4* 和 ds*GFP* 以及未经任何处理的 CK 的白背飞虱 3 龄若虫 1 d 后活力较强的 15 头试虫转移到分蘖期的 TN1 水稻上，连续观察 7 d，统计每天的存活数和死亡数，及时清除死亡个体，计算存活率，每个处理重复 3 次。

1.8 取食抗虫和感虫水稻品种后白背飞虱 MCO4 基因的表达量检测

将初羽化 24 h 内的白背飞虱雌、雄成虫各 10 头分别饲养于 IR26 和 IR36 2 个抗虫水稻品种上，以饲养于 TN1 水稻敏感品种上的雌、雄成虫作为对照，每个处理设置 3 个重复，取食 24 h 后，利用 TRIzol Reagent 提取试虫的 RNA，利用天根反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。利用 RT-qPCR 检测白背飞虱成虫取食 IR26，IR36 和 TN1 品种后 MCO4 基因的表达量。利用 ABI 7500 Real-Time PCR System（Applied Biosystems，Foster City，CA，美国）进行表达量的 RT-qPCR 检测。RT-qPCR 的反应体系：SYBR Premix ExTaq^{TM}（2 ×）10 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 0.4 μL，ROX Reference Dye（50 ×）0.04 μL，cDNA 模板（20 ng）4 μL，超纯水补足至 20 μL。RT-qPCR 反应程序：95℃ 2 min；95℃ 10 s，60℃ 31 s，40 个循环。反应后进行熔解曲线分析，排除了特异性 PCR 产物的污染。用 ABI 7500 Software v2.0.5 软件（Applied Biosystems，CA，美国）进行数据记录和分析。用灭菌的超纯水代替 cDNA 模板作为空白对照，共设置 3 次生物学重复。以 *L9* 和 *L10* 作为内参基因进行相对定量。

1.9 取食抗虫和感虫水稻品种后白背飞虱成虫体重测定

将初孵化的白背飞虱 1 龄若虫，每重复 3 头，分别接种到 IR26 和 IR36 2 个抗虫水稻品种上，以接种到 TN1 水稻品种上的白背飞虱 1 龄若虫作为对照，每个品种设置 25 个重复。每 3 d 更换 1 次水稻，直至饲养至成虫，分别记录其雄虫、雌虫的体重。

1.10 数据分析

利用 C_T 值相对定量法计算 MCO4 基因的相对表达量，将对照组白背飞虱 MCO4 基因表达量数值设为 1，其他样品表达量根据与对照组的比例进行分析。所有数据分析都用 SPSS 20.0 数据分析软件，采用单因素方差分析（ANOVA，$P < 0.05$）进行分析。实验结果以平均值 ± 标准差（*SD*）表示，利用 SPSS 软件中 Independent-Samples *T* 检验进行独立样本 *t* 检验，$P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 白背飞虱 MCO4 基因的序列分析

白背飞虱 MCO4 基因的开放阅读框长 2 166 bp，编码含 721 个氨基酸残基、分子量为 80.7 kD 的蛋白，该蛋白质的等电点为 6.03。SignalP 和 TMHMM 的预测结果表明，MCO4 蛋白具有分泌信号肽，剪切位点位于 N 端第 36 和 37 个 aa 之间，没有跨膜区域。因此，该蛋白很可能是白背飞虱的唾液分泌蛋白。该蛋白具有 3 个多铜氧化酶的保守区域以及 1 个铜离子结合位点（图 1）。

2.2 白背飞虱 MCO4 基因的进化分析

将白背飞虱 MCO4 基因序列在 NCBI 核酸数据库进行 BlastX 比对，应用 ClustalX2 软件进行序列相似性分析，找到与目的基因相似度较高的其他昆虫的氨基酸序列。结果显示，目的基因与其他昆虫的相似度较高，已报道的褐飞虱 MCO4 与白背飞虱 MCO4 的氨基酸序列一致性高达 78%。利用 MEGA 6 软件和 NJ 方法构建了不同目昆虫 MCO4 的系统发生树，从系统发生树中可以看出白背飞虱与褐飞虱聚为一支，支持率为 100%（图 2）。

2.3 dsRNA 的合成

根据试剂盒说明书合成 *MCO4* 和 *GFP* 基因的 dsRNA 然后纯化。dsRNA 的浓度用紫外分光光度计检测，两者浓度均用 RNase-free H_2O 稀释到需要的浓度。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测，电泳结果显示已经得到了对照基因 *GFP* 的 dsRNA（524 bp）和白背飞虱 *MCO4* 的 dsRNA（583 bp）特异条带（图 3），即可以用于后续实验。

```
atgtccaggactgctatcttgaatccactaaatggatgcgagagtgaaaatgttttgttactggtcttgattggaatcacgctaaacttacatggagtatatggtgctggagaagaaata
 M  S  R  T  A  I  L  N  P  L  N  G  C  E  S  E  N  V  L  L  L  V  L  I  G  I  T  L  N  L  H  G  V  Y  G  A  G  E  E  I
aatgagcaaaacccgccaggcggcttcatacctcgtagcggatttggaggtgactgcgaggctgaaaaaaaaaaactggatccattgtccaagtaccttcagcctgatgacattgccagt
 N  E  Q  N  P  P  G  G  F  I  P  R  S  G  F  G  G  D  C  E  A  E  K  K  K  L  D  P  L  S  K  Y  L  Q  P  D  D  I  A  S
ggaaaatatgatttcttactccggcaccaaattcaacactatgcacaagaccttgcaagaggaatgatccgaaaatttgctactataagtttgatgtggatcgtttcgctacaatggga
 G  K  Y  D  F  L  T  P  A  P  N  S  T  L  C  T  R  P  C  K  R  N  D  P  K  I  C  Y  Y  K  F  D  V  D  R  F  A  T  M  G
ttgccttgccggaaatgccctaatccaatagagcagtgtaacagagcacattgtattgctgctgatggttttgaaaaatcaatcgtcgttgtcaatcatctcctgccaggtccttcaatt
 L  P  C  R  K  C  P  N  P  I  E  Q  C  N  R  A  H  C  I  A  A  D  G  F  E  K  S  I  V  V  V  N  H  L  L  P  G  P  S  I
caagtttgtgagggagacacaatagtagttgatgtgaaaaatggtatgggagggtctaccatcacaattcactggcatggtttgactcaaactggcacaccccatatggatggggtacct
 Q  V  C  E  G  D  T  I  V  V  D  V  K  N  G  M  G  G  S  T  I  T  I  H  W  H  G  L  T  Q  T  G  T  P  H  M  D  G  V  P
atgatcacccagtgccccatattggagaaccaggttttccgttacactttcaaaccggacaaccctggaacgtttttttggcactctcattcaggactacagaagcttgatggatttgaa
 M  I  T  Q  C  P  I  L  E  N  Q  V  F  R  Y  T  F  K  P  D  N  P  G  T  F  F  W  H  S  H  S  G  L  Q  K  L  D  G  F  E
ggcagtctgatagtacgacaaccggacaatcaacagcattacagaaatttatatgattatgatttgccttcacatattatcttcctacaagattggctacacataactgccgatgagttc
 G  S  L  I  V  R  Q  P  D  N  Q  Q  H  Y  R  N  L  Y  D  Y  D  L  P  S  H  I  I  F  L  Q  D  W  L  H  I  T  A  D  E  F
tatcagggattgagaaataacccggtgggggatttacctaatacctatttgatcaatggaaaagcaagatccaggaatcctgacggtagcgactatagtaaaacaccattcacagtatac
 Y  Q  G  L  R  N  N  P  V  G  D  L  P  N  T  Y  L  I  N  G  K  A  R  S  R  N  P  D  G  S  D  Y  S  K  T  P  F  T  V  Y
aaaatcaaaagtgattacagctatctattccacataattggtggtacttgtacggtgtgtccagtcagagtgcaaatagagaatcatcttatgacaataattggtgttgatggtagggat
 K  I  K  S  D  Y  S  Y  L  F  H  I  I  G  G  T  C  T  V  C  P  V  R  V  Q  I  E  N  H  L  M  T  I  I  G  V  D  G  R  D
acacaaccgaagacagttgcatctgtaacactggcagctggtgagcgagtgcgagttataataaatggaaaaaggacaccgaacaagtactacttctggatacatgcagtaccggtcggt
 T  Q  P  K  T  V  A  S  V  T  L  A  A  G  E  R  V  R  V  I  I  N  G  K  R  T  P  N  K  Y  Y  F  W  I  H  A  V  P  V  G
atttgtgagagtatattgaaaaacaacgtggtgggagaagcccttctggtgtacacggatggcccccaagcaccctctggacctatagactttgagactcttgtgagaaagaaacaattg
 I  C  E  S  I  L  K  N  N  V  V  G  E  A  L  L  V  Y  T  D  G  P  Q  A  P  S  G  P  I  D  F  E  T  L  V  R  K  K  Q  L
gatccacccaagactagatttggtaatcccagcgtagcatgcactgggaaaagagatgcacaaggtattcttgaactatgctacaaacatttgagaggtgatcagttggcaccattgggc
 D  P  P  K  T  R  F  G  N  P  S  V  A  C  T  G  K  R  D  A  Q  G  I  L  E  L  C  Y  K  H  L  R  G  D  Q  L  A  P  L  G
attttgaatccacccaaagagtttaaaaatcaagtaatcattggtgttggagagtacacttataacgataacattgacgaagcttatcctctcgatggctccactaagatggcattcaat
 I  L  N  P  P  K  E  F  K  N  Q  V  I  I  G  V  G  E  Y  T  Y  N  D  N  I  D  E  A  Y  P  L  D  G  S  T  K  M  A  F  N
ccaattgggaacattccaatgaccaacactgtgaacggtattgcatttgttatgccacccgtacccctgctgacacaatacgacgacgtcccacaatgcctgttttgctcatcaaataat
 P  I  G  N  I  P  M  T  N  T  V  N  G  I  A  F  V  M  P  P  V  P  L  L  T  Q  Y  D  D  V  P  Q  C  L  F  C  S  S  N  N
cctttcaagaggtggactaaaatcgaatattgtttgcacgtctttcgggttgaatatccttctatcgttgagatggttctggttgatatagatccacccgatcacagtagtccaagaacg
 P  F  K  R  W  T  K  I  E  Y  C  L  H  V  F  R  V  E  Y  P  S  I  V  E  M  V  L  V  D  I  D  P  P  D  H  S  S  P  R  T
ggaaggatatctcacccatggcacactcatggctatgaccagtacctggttgatcaaggattgttccagactgaggacatcggcacagagctacagaatctgcttggcaagttggagagg
 G  R  I  S  H  P  W  H  T  H  G  Y  D  Q  Y  L  V  D  Q  G  L  F  Q  T  E  D  I  G  T  E  L  Q  N  L  L  G  K  L  E  R
aaggaaatcgttcctcccgattatcccatactgaaagatacgtggctggtaccatccggaggatatgtggtgatcaggatagtcgctaataatccaggtttctggttcatgcactgtcac
 K  E  I  V  P  P  D  Y  P  I  L  K  D  T  W  L  V  P  S  G  G  Y  V  V  I  R  I  V  A  N  N  P  G  F  W  F  M  H  C  H
ttcgcctaccatcatgagagaggaatggcggctgtgctaaaagttggacacacgactgacaatccacccccctcccgattacttcccaaaatgttccaactacttggaaactccagaccta
 F  A  Y  H  H  E  R  G  M  A  A  V  L  K  V  G  H  T  T  D  N  P  P  P  P  D  Y  F  P  K  C  S  N  Y  L  E  T  P  D  L
gactaa
 D  -
```

图 1　白背飞虱 *MCO*4 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　cDNA and deduced amino acid sequences of *MCO*4 of *Sogatella furcifera*

方框内区域为信号肽，阴影区域为多铜氧化酶保守区域，下划线部分为铜离子结合位点。The boxed region is the signal peptide, the shaded region is the conservative region of the copper oxidase, and the underlined part is the copper ion binding site.

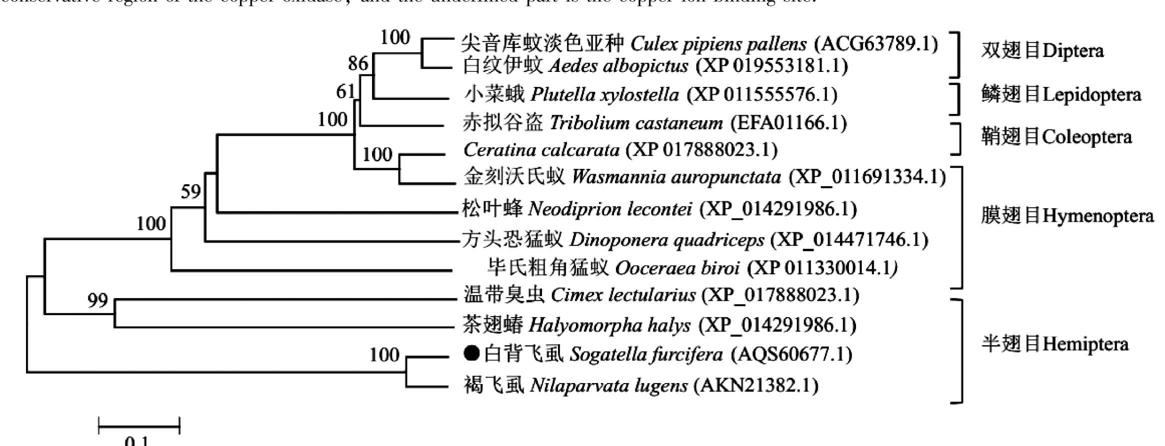


图 2　邻接法构建的基于氨基酸序列的不同昆虫 MCO4 蛋白的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of MCO4 proteins from different insect species based on the amino acid sequence by neighbor-joining method

分支上的数字表示 1 000 次重复抽样符合聚类的百分数；标尺表示每单位长度位点替代率。The numbers on the branches represent the percentages of times that the species are grouped together in the bootstrap analysis for 1 000 replicates. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit of branch length.

2.4　饲喂 *MCO*4 dsRNA 后白背飞虱 MCO4 基因相对表达量的变化

选择 0.5 μg/μL 的 *MCO*4 dsRNA 浓度饲喂白背飞虱 3 龄若虫，RT-qPCR 检测结果表明，饲喂 2，4，6 和 8 d 后 MCO4 基因的表达与对照组相比并没有显著下调（图 4）。由于饲喂的效率不高，因此我们尝试显微注射法。

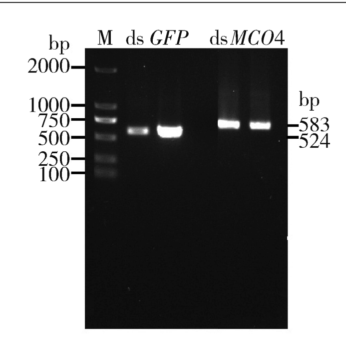


图 3 白背飞虱 *MCO4* dsRNA 及 *GFP* dsRNA 合成电泳图

Fig. 3 Agrose gel electrophoresis of dsRNA synthesis of *MCO4* and *GFP* of *Sogatella furcifera*

M: DL2000 Marker.

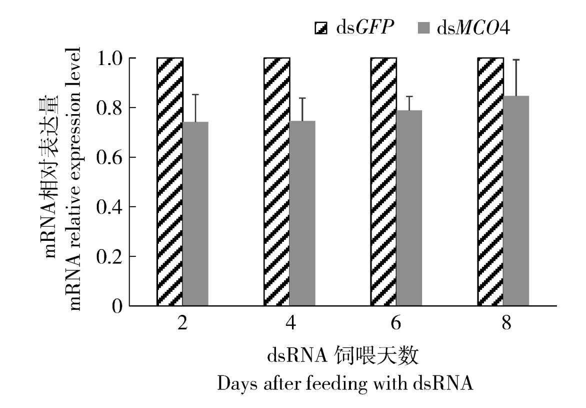


图 4 饲喂 0.5 μg/μL *MCO4* dsRNA 不同天数后白背飞虱 3 龄若虫 *MCO4* mRNA 的表达水平

Fig. 4 mRNA expression levels of *MCO4* in the 3rd instar nymphs of *Sogatella furcifera* fed with 0.5 μg/μL *MCO4* dsRNA for different days

图中数据为平均值 ± 标准差。以 ds*GFP* 的表达量为参照，将其表达量定为 1.0。Data in the figure are mean ± *SD*. The mRNA expression level of ds*GFP* is designated as 1.0. 图 5 同 The same for Fig. 5.

2.5 显微注射 *MCO4* dsRNA 后白背飞虱 MCO4 基因相对表达量的变化

白背飞虱 3 龄若虫显微注射 *MCO4* dsRNA 后，第 2 天 *MCO4* 的表达水平极显著降低（$P<0.01$），只有对照组的（注射 *GFP* dsRNA）27.72%，这种基因沉默现象从注射后第 2 – 8 天一直持续。其中第 4 天 *MCO4* mRNA 的表达水平达到最低，只有对照的 5.53%。随后 *MCO4* 的表达水平虽然有所恢复，但还是被持续抑制，不能恢复到正常水平（图 5）。

2.6 MCO4 基因沉默后对白背飞虱若虫存活率的影响

如图 6 所示，注射 *MCO4* dsRNA 2 d 内，由于注射产生的机械损伤，各组若虫死亡率均较高；在注射 4 d 后，不同注射组间若虫存活率开始产生差异，

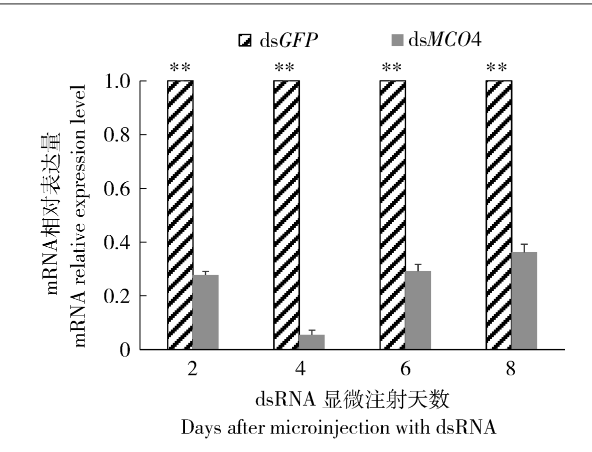


图 5 显微注射 *MCO4* dsRNA 不同天数后白背飞虱 3 龄若虫 *MCO4* mRNA 的表达水平

Fig. 5 mRNA expression levels of *MCO4* in the 3rd instar nymphs of *Sogatella furcifera* after microinjection with *MCO4* dsRNA for different days

图中数据为平均值 ± 标准差，柱上双星号表示基因表达量在处理组与对照组（ds*GFP*）间存在极显著差异（*t* 检验，$P<0.01$）。Data in the figure are mean ± *SD*. The double asterisk above bars indicates extremely significant differences in the gene expression level between the treatment group and the control group (ds*GFP*) (*t*-test, $P<0.01$).

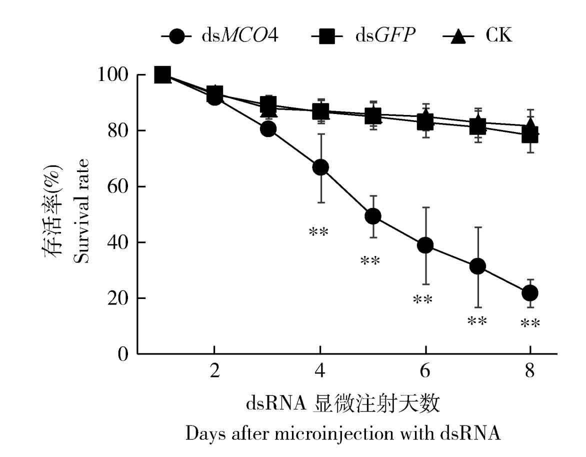


图 6 白背飞虱 3 龄若虫 MCO4 基因沉默不同时间对其存活率的影响

Fig. 6 Effect of silencing MCO4 gene for different time on the survival rates of the 3rd instar nymphs of *Sogatella furcifera*

ds*GFP* 作为阴性对照组。图中数据为平均值 ± 标准差，双星号表示处理组与对照组（CK）相比存活率存在极显著差异（*t* 检验，$P<0.01$）。ds*GFP* was used as the negative control. Data in the figure are mean ± *SD*. The double asterisk indicates extremely significant differences in the survival rate between the treatment group and the control group (CK) (*t*-test, $P<0.01$).

ds*MCO4* 处理组若虫存活率始终显著低于 ds*GFP* 组（阴性对照组）和 CK 组（$P<0.01$）。

2.7 白背飞虱成虫取食不同水稻品种后 MCO4 基因表达量的变化

RT-qPCR 技术检测白背飞虱成虫分别取食感

虫品种 TN1 及抗虫品种 IR26 和 IR36 24 h 后其体内 MCO4 基因表达量的差异，结果显示取食品种 IR26 与 TN1 相比，白背飞虱成虫体内的 MCO4 基因表达量极显著升高（$P<0.01$）；取食品种 IR36 后，白背飞虱成虫体内的 MCO4 基因表达量并无显著变化（$P>0.05$）（图 7）。

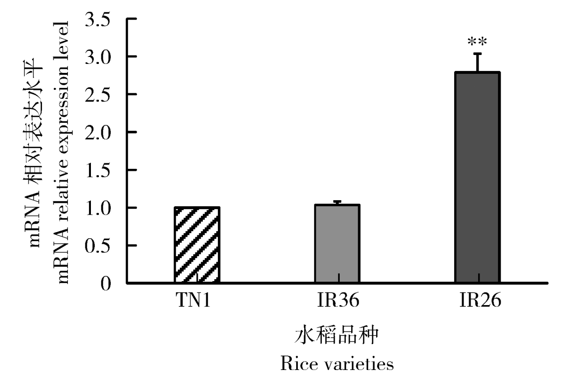


图 7　白背飞虱成虫分别取食水稻感虫品种 TN1 及抗虫品种 IR26 和 IR36 24 h 后体内 *MCO4* 表达量的变化

Fig. 7　Changes in expression levels of *MCO4* in *Sogatella furcifera* adults after feeding on the susceptible rice variety TN1 and the resistant rice varieties IR26 and IR36 for 24 h

将取食 TN1 的成虫（对照）中基因表达量定为 1.0。图中数据为平均值 ± 标准差，柱上双星号表示基因表达量在处理组与对照组间存在极显著差异（*t* 检验，$P<0.01$）。The gene expression level in adults feeding on TN1 (control) is designated as 1.0. Data in the figure are mean ± *SD*. The double asterisk above bars indicates extremely significant differences in the gene expression level between the treatment group and the control group (*t*-test, $P<0.01$).

2.8　白背飞虱取食不同水稻品种后成虫体重的变化

白背飞虱若虫在 IR26 上发育至成虫后，与在感虫品种水稻 TN1 上取食发育的成虫相比，雌、雄成虫的体重均显著低于对照组（$P<0.05$），而在 IR36 上发育的成虫体重与对照组相比并无显著差异（$P>0.05$）（图 8）。

3　讨论

唾液在半翅目昆虫的取食过程中发挥着重要的作用，唾液具有润滑口器、溶解食物以及携带消化酶的作用（黄志君等，2007）。黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* 中多铜氧化酶通过参与唾液鞘的形成以及同植物的酚类发生聚合反应来抵抗昆虫的防御反应，辅助昆虫的取食行为（Hattori *et al.*，2005）。白背飞虱取食寄主植物的过程中，唾液发挥着十分重要的作用（Cook and Denno，1994；Hattori *et al.*，

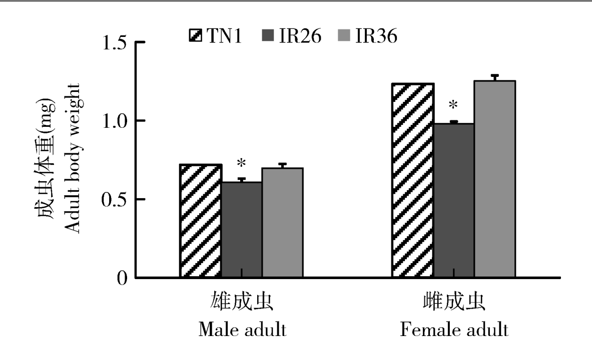


图 8　取食水稻感虫品种 TN1 和抗虫品种 IR26 和 IR36 的白背飞虱成虫体重差异

Fig. 8　Difference in the adult body weight of *Sogatella furcifera* feeding on the susceptible rice variety TN1 and the resistant rice varieties IR26 and IR36

图中数据为平均值 ± 标准差，柱上星号表示成虫体重在处理组与对照组（取食 TN1）间存在显著差异（$P<0.05$，*t* 检验）。Data in the figure are mean ± *SD*. The asterisk above bars indicates significant differences in the adult body weight between the treatment group and the control group (feeding on TN1) ($P<0.05$, *t*-test).

2010），MCO4 基因可能发挥着解毒或摄取汁液的生理作用，MCO4 基因表达量的降低极有可能会导致白背飞虱的取食量减少，进而引起发育期的延长、产卵率的减少以及死亡率的提高（于飞等，2004）。之前研究表明 MCO4 基因在白背飞虱唾液腺的各个发育阶段均有表达，且各阶段间表达量并无显著差异，白背飞虱各个发育阶段均靠刺吸水稻的韧皮部来获得生长发育所需的营养物质（Li *et al.*，2016）。

系统发育树中的 5 个目昆虫既存在咀嚼式口器又包含刺吸式口器，然而这 5 个目昆虫 MCO4 基因差异不大，具有明显的亲缘关系（图 2）。这可能是由于 MCO4 基因广泛存在于多种昆虫当中，具有相似的结构与功能，长期的进化导致 MCO4 基因在多种昆虫中无显著差异（Perutz，1983）。同一科的褐飞虱和白背飞虱的 MCO4 蛋白聚为一支，支持率为 100%（图 2）。

本研究以白背飞虱 MCO4 基因的开放阅读框为基础合成白背飞虱 *MCO4* dsRNA。由于白背飞虱不同个体取食能力的差异，以及 dsRNA 在室温下会发生一定程度的降解等多项因素的综合影响，饲喂法 RNAi 未能显著降低白背飞虱若虫 MCO4 基因的表达水平（图 4）。而通过显微注射法导入 *MCO4* dsRNA 后，靶标基因被持续抑制，抑制作用会随着时间发生改变，白背飞虱若虫的 MCO4 基因沉默现象在处理后第 2 – 8 天持续出现，呈现出显微注射前期靶标基因抑制作用逐渐增强，达到峰值后有缓慢减弱的趋势（图 5）。随后 MCO4 基因的表达水平虽

然有所恢复,但仍然被持续抑制,不能恢复到正常水平。推测是由于显微注射法直接将 dsRNA 注射到位于白背飞虱唾液腺的前中足之间的隔膜区域,接近唾液腺位置,从而抑制 MCO4 基因的表达。

本研究结果发现,MCO4 基因沉默后的前 2 d,白背飞虱 3 龄若虫的存活率与对照组相比并无显著差异,而到第 4 天 MCO4 基因沉默后其存活率始终低于对照组,达到显著差异(图 6),因此该基因可能是白背飞虱取食过程中的重要基因。

已有的研究证实水稻品种 IR26 对褐飞虱种群显示中到高抗,抗性水平不稳定,而品种 IR36 在褐飞虱种群中显示中抗(吴荣宗, 1980)。本研究利用 RT-qPCR 方法检测白背飞虱成虫取食 3 种水稻品种 TN1,IR26 和 IR36 后,其体内 MCO4 基因的表达情况。结果显示白背飞虱取食抗性水稻品种 IR26 后,与取食感虫品种 TN1 相比,MCO4 基因的表达发生了显著的变化(图 7)。在 IR26 上生长发育的白背飞虱成虫体重显著低于取食 TN1 的对照组的,与褐飞虱在 IR26 上的相关结果(董必琴, 2013)趋势相同。

参考文献(References)

Andersen SO, Peter MG, Roepstorff P, 1996. Cuticular sclerotization in insects. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 113(4): 689–705.

Bento I, Martins LO, Lopes GG, Carrondo MA, Lindley PF, 2005. Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Trans.*, 7(21): 3507–3513.

Cook AG, Denno RF, 1994. Planthopper/plant interactions: feeding behavior, plant nutrition, plant defense, and host plant specialization. In: Denno RF, Perfect TJ eds. Planthoppers: Their Ecology and Management. Chapman and Hall, London. 114–139.

Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 34(1): 29–41.

Dong BQ, 2013. Reversal of Resistance to Insecticides and Ecological Fitness to Rice Varieties of *Nilaparvata lugens* (Stål) Populations Collected from Rice Fields. MSc Thesis, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang. [董必琴, 2013. 褐飞虱田间种群的抗药性逆转及其对水稻品种的适应性. 浙江金华: 浙江师范大学硕士学位论文]

Gregorio ED, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B, 2001. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(22): 12590–12595.

Hattori M, Konishi H, Tamura Y, Konno K, Sogawa K, 2005. Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, nephotettix cincticeps. *J. Insect Physiol.*, 51(12): 1359–1365.

Hattori M, Tsuchihara K, Noda H, Konishi H, Tamura Y, Shinoda T, Nakamura M, Hasegawa T, 2010. Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 40(4): 331–338.

Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kües U, 2010. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J.*, 273(10): 2308–2326.

Huang ZJ, Zeng WN, Hu ZY, 2007. Progress of study on insect salivary gland. *Guangdong Sericult.*, 41(2): 44–48. [黄志君, 曾文年, 胡占英, 2007. 昆虫唾液腺的研究进展. 广东蚕业, 41(2): 44–48]

Kramer KJ, Kanost MR, Hopkins TL, Jiang H, Yu CZ, Xu R, Kerwin JL, Turecek F, 2001. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 57(2): 385–392.

Li Z, An XK, Liu YD, Hou ML, 2016. Transcriptomic and expression analysis of the salivary glands in white-backed planthoppers, *Sogatella furcifera*. *PLoS ONE*, 11(7): e0159393.

Loera Corral O, Pérez Pérez MCI, Barbosa Rodríguez JR, Villaseñor Ortega F, Guevaragonzúlez RG, Torrespacheco I, 2006. Laccases. Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, San Diego, La Jolla, USA.

Perutz MF, 1983. Species adaptation in a protein molecule. *Mol. Biol. Evol.*, 1(1): 1–28.

Shen JH, Shang JM, Liu GJ, 2003. Management of the witebacked panthopper, *Sogatella furcifera* in China: a mini-review. *Chin. J. Rice Sci.*, 17(Suppl.): 7–22. [沈君辉, 尚金梅, 刘光杰, 2003. 中国的白背飞虱研究概况. 中国水稻科学, 17(增刊): 7–22]

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729.

Wu RZ, 1980. Studies on resistance of rice varietes to the brown planthoper. *Acta Phytophy. Sin.*, 7(3): 133–138. [吴荣宗, 1980. 水稻品种对稻褐飞虱抗性的研究. 植物保护学报, 7(3): 133–138]

Ye YX, Pan PL, Kang D, Lu JB, Zhang CX, 2015. The multicopper oxidase gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 63: 124–132.

Yu F, Zeng XN, Zhang S, Luo Y, Ju JH, 2004. Effects of feed quantity on growth and development of insects. *Guangdong Agric. Sci.*, (1): 42–44. [于飞, 曾鑫年, 张帅, 骆悦, 居建华, 2004. 取食量对昆虫生长发育影响的研究. 广东农业科学, (1): 42–44]

Zhang J, Liu X, Zhang J, Li D, Sun Y, Guo Y, Ma E, Zhu KY, 2010. Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase 1 gene by RNAi is lethal to the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 40(11): 824–833.

(责任编辑: 马丽萍)